580.7
G28t
no. 579

Université de Genève — Institut de Botanique, Prof. Dr R. Chodat
9me série — IVme fascicule

Le Gentiana Lutea L. et sa fermentation

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Henry GUYOT
PHARMACIEN

GENÈVE
Imprimerie Jent, Boulevard Georges-Favon, 11 et 26
—
1917

THÈSE N° 579

Université de Genève — Institut de Botanique ; Prof. Dr R. Chodat
9me série — IVme fascicule

Le Gentiana Lutea L. et sa fermentation

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Henry GUYOT
PHARMACIEN

GENÈVE
Imprimerie Jent, Boulevard Georges-Favon, 11 et 26
—
1917

THÈSE N° 579

La Faculté des Sciences, sur le préavis de Monsieur le Professeur R. Chodat, autorise l'impression de la thèse présentée par M. H. Guyot, intitulée : « Le Gentiana Lutea L. et sa fermentation », sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 5 Juillet 1916.

Le Doyen,

H. Fehr.

A la mémoire de ma très chère et regrettée mère.

A Monsieur le Professeur Robert Chodat, en témoignage de vive estime et de profonde reconnaissance.

Le Gentiana lutea L.
et sa fermentation

par

Henry GUYOT

(Communiqué en séance du 9 octobre 1916)

INTRODUCTION

Les plantes contenant de fortes proportions de sucres ou de polysaccharides ont été, dès la plus haute antiquité, utilisées pour obtenir un liquide alcoolique plus ou moins aromatique par fermentation. Depuis une vingtaine d'années, on s'est mis à étudier scientifiquement toute une série de fermentations.

On a trouvé que les agents de cette activité chimique étaient soit des bactéries, soit des champignons, tels que les *Penicillium*, les *Aspergillus* ou des Mucoracées, soit enfin des levures, organismes abondants partout.

Ainsi la bière des nègres Cafres préparée avec du maïs (source de polysaccharides) se fait par adjonction d'une plante *(Koerri)* qui introduit dans le liquide à fermenter de nombreuses levures et moisissures. Cette microflore, étudiée par CHAPMAN et BAKER[1], s'est révélée comme très riche.

Une autre bière des Cafres, le *Pombe*, qui est préparée avec du millet, contient, pendant sa fermentation, de nombreuses bactéries et moisissures, des levures et des champignons imparfaits, ainsi que l'ont relevé F. ROTHENBACH[2], puis P. LINDNER[3] et SANDER[4].

[1] CHAPMAN, Ch. et BAKER, S. *Journal of the fed. inst. of brewing*, XIII (1907), 633.
[2] ROTHENBACH, F. *Wochenschrift für Brauerei* (1897), 477.
[3] LINDNER, P. *Wochenschrift für Brauerei* (1891), 815.
[4] SANDER. *Wochenschrift für Brauerei* (1900), 358.

On connaît le fameux *Saké* ou vin de riz des Japonais; il s'obtient par fermentation d'empois de riz, au moyen du *Koji,* sorte de galettes de riz couvertes de moisissures, de Mucorinées et de levures. SAITO[1], KOZAI[2], YABÉ[3], FUJITA[4], TAKAHASHI[5] et NAKAZAWA[6] ont étudié successivement l'action spécifique de ces organismes si précieux pour la fabrication de leur boisson nationale.

En Chine, la fermentation du vin de riz est produite par le *Ragi* et le *Ang Khag,* galettes de riz pétries de champignons et analogues au *Koji.*

Une boisson alcoolique des îles Luchu, près de Formose, l'*Anamori* a donné à JNUI qui l'a étudiée, toute une série de levures et de moisissures.

NECHITCH dit qu'en Inde la levure du Sikkim *(Mucor Prainii)* et la levure du Khasia *(Dematium Chodati)* sont d'actifs producteurs d'alcool[7].

Beaucoup de fruits sont soumis à la fermentation; ainsi les patates au Japon donnent une liqueur aromatique; les cœurs de l'*Agave Tequilana*[8] fournissent le *Mezcal* ou liqueur d'Agave. ROLANTS, puis ULPIANI et SARCOLI[9] ont fait fermenter avec succès du suc de figues. Les baies de sureau, les glands de chêne (RUDAKOW), les résidus de l'extraction du tapioca, du sagou et de l'arrow-root[10], les bulbes d'*Urginea maritima* et d'*Asphodelus albus* Willd. et ses variétés *ramosus L.* et *microcarpus* Viv.[11] d'Algérie, les topinambours *(Helianthus tuberosus L.)*[12] fermentent tous facilement, en donnant des quantités de liquides alcooliques plus ou moins grandes et aromatiques.

Cependant la racine du *Gentiana lutea* L. qui a été assez bien étudiée au point de vue chimique parce qu'elle avait attiré l'attention par ses propriétés amères et thérapeutiques, n'a, jusqu'ici — du moins à notre connaissance — donné lieu à aucun travail sur sa fermentation. Dans les pays où croît cette plante, on en obtient par ce processus un alcool

[1] SAITO, K. *Kochs Jahresb.*, XV (1904), 293.
[2] KOZAI, Y. *Centralblatt für Bakt.*, VI (1900), 385.
[3] KOZAI, Y. et YABÉ. *Centralblatt für Bakt.*, I (1895), 619.
[4] FUJITA, M. *Kochs Jahresb.*, XXIII (1902), 324.
[5] TAKAHASHI, T. *Bull. of the College of. Agric.*, Tokyo, VI (1905), 79
[6] NAKAZAWA, R. *Centralblatt für Bakt.*, XXII (1909), 529.
[7] NECHITCH, *Thèse de l'Institut botanique de Genève* (1904).
[8] KOHLER, H. *Die deutsche Essigindustrie* (1907), 225.
[9] ULPIANI, C. et SARCOLI, L. *Atti Regia Academia dei Lincei*, XI (1902), 173.
[10] NYLANDER, E. *Engler Patent.* n° 18391 (1907).
[11] RIVIÈRE et BAILHACHE. *Comptes rendus de l'Académie de Paris,* CXXI (1895), 659.
[12] KUES, W. *Allg. Zeitschr. für Bierbrauerei und Malzfabrik.* (1900), 211.
[13] LÉVY, L. *Comptes rendus de l'Académie de Paris,* CXVI (1893), 1381.

connu sous le nom de *liqueur de gentiane* ou *gentiane* simplement. Nous avons essayé dans ce travail d'en préciser les conditions de fermentation.

Dans un premier chapitre, nous donnons un court aperçu historique, suivi du mode de préparation usité chez les paysans. Pour comprendre ce qui se passe exactement pendant la fermentation par les levures, il était nécessaire de donner un aperçu des nombreux travaux chimiques sur cette question ; c'est ce qui constitue le second chapitre.

Dans le troisième, nous avons énuméré les différents ferments que contient cette racine et qui prennent part, dans une certaine mesure, à cette fermentation.

Le chapitre suivant est consacré à la distribution géographique de cette plante, accompagnée de celle où se pratique la préparation de liqueur.

Nous avons eu recours à la science de nombreux botanistes, surtout pour ce qui concerne la distribution géographique ; un questionnaire expédié dans toutes les régions où croît cette plante, pouvant seul établir sa dispersion exacte.

A tous ces précieux collaborateurs, nous adressons nos sincères remerciements. Ce sont : M. le professeur Chodat qui, au cours de ce travail, n'a cessé de nous guider avec toute sa maîtrise et ses conseils si estimés ; M. le professeur A. Lendner ; M. G. Beauverd ; M. le Dr J. Briquet, à Genève ; M. le professeur Gradmann, à Tubingue ; M. le professeur Dr Fünfstück, Stuttgart ; M. le professeur Dr Pax, Breslau ; M. le professeur Heinricher, Innsbruck ; M. le Dr V. Grafe, Vienne ; M. le professeur Dr Kossowicz, Vienne ; M. le professeur Dr Jost, Fribourg-en-Brisgau ; M. le professeur Dr P. Guignier, à Nancy ; M. le professeur Flahaut, Montpellier ; M. le professeur Pereira Coutinho, Lisbonne ; M. le docteur Pau, Segorbe ; M. le professeur Terraciano, Sassari et M. le prof. Dr Grintzesco, Bucarest.

A Monsieur H. Junod, pharmacien à Genève, et à mon très cher ami Paul Brun, je témoigne toute ma gratitude pour leurs précieux services.

HISTORIQUE

La gentiane jaune, cette plante qui caractérise si bien les pâturages calcaires de l'Europe moyenne, a éveillé depuis longtemps la sagacité des naturalistes. PLINE[1] déjà raconte que, grâce à la racine de cette plante, GENTIUS, roi d'Illyrie (cent cinquante ans avant Jésus-Christ), recouvrit des forces nouvelles pour continuer ses guerres. C'est LINNÉ qui décrivit le genre *Gentiana* qu'il dédia à ce roi.

Les plus anciennes indications pour la fabrication et l'utilisation de la liqueur de gentiane se trouvent, à notre connaissance, dans ZWINGER[2]; on lit dans son *Kräuterbuch* de l'année 1696 : ... *das destillierte Enzianwasser stärket den kalten Magen, fürderet den Harn ;* HALLER en fait également une courte mention dans son histoire des plantes helvétiques : *Spiritum etiam fortem dat quo Sanganenses plurimum utuntur...*

MODE DE PRÉPARATION DE LA LIQUEUR DE GENTIANE

Nous avons interrogé à ce sujet plusieurs paysans du Jura bernois pour nous documenter. Tous nous ont, à peu de chose près, indiqué la même méthode, qu'on peut résumer comme suit :

Les pieds de gentiane de belle venue sont, en général, les seuls arrachés. En Valais et en Savoie, on utilise également le *Gentiana purpurea* L.. Dans les Grisons, d'après une communication de M. le professeur TARNUZZER, de Coire, les trois gentianes suivantes sont employées : *Gentiana lutea* L., *Gentiana purpurea* L., *Gentiana punctata* L. Dans

[1] PLINE. Livre 25, chapitre VII.
[2] ZWINGER. *Kräuterbuch,* Basel (1696), 633.
[3] HALLER, A. DE. *Hist. Stirp. Helv.,* I, 283.

les Carpathes, M. le professeur Dr Pax me dit qu'il n'a vu employer que le *Gentiana punctata* L. et pas le *Gentiana lutea* L. dans la fabrication de la liqueur.

L'arrachage se fait au moyen d'un instrument tout spécial et uniquement employé dans ce but (voir fig. 1, 1.). C'est une très forte pioche en forme de dent, légèrement arquée, longue de cinquante centimètres environ, sur quatre de large. Cette longueur est nécessaire, car la racine s'enfonce très profondément, et il est souvent difficile de l'extraire, surtout dans les terrains rocailleux du Jura (lapiaz fréquents). La meilleure époque, d'après tous les paysans, est le mois d'août. D'après L. Lévy, on peut l'arracher à partir du 15 août. Le quintal est payé huit francs. Cependant, beaucoup l'arrachent même en septembre, leurs travaux agricoles les empêchant de s'occuper de cette préparation au mois d'août. La racine fraîchement arrachée est immédiatement coupée en petits fragments d'un centimètre de diamètre au moyen d'un second instrument spécial, lui aussi, sorte de double pelle dont les deux lames se croisent à angle droit (voir fig. 1, 2.) et mesurant dix-huit centimètres de long sur dix-huit centimètres de large.

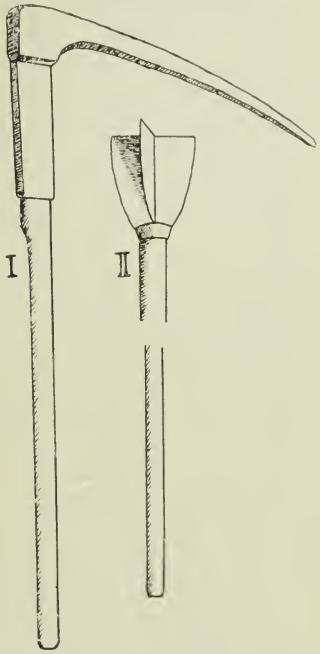

Fig. 1.— 1 : Pioche utilisée pour l'arrachage de la racine ; 2 : Double pelle tranchante servant à couper la racine en petits fragments.

On remplit entièrement des tonneaux de racines ainsi divisées et on verse de l'eau de façon à couvrir exactement les racines. On ferme le tonneau et on le place en général dans une écurie, où la température est de 18° environ, ce qui convient le mieux à la fermentation. Pendant les premiers jours, le niveau de l'eau descend, par suite de l'absorption d'une certaine quantité par les racines ; puis il remonte lorsque la fermentation commence. Au bout de six semaines à deux mois[1], la fermentation est terminée et le tout est soumis à une première distillation. Dans l'île de Sardaigne, M. le professeur Terraciano m'indique qu'au bout de trois semaines, la fermentation est terminée. Le distillat est distillé une seconde fois.

[1] Schröter, C. Dans son *Pflanzenleben der Alpen*, indique trois à six semaines.

la première liqueur ayant, d'après les paysans, un goût désagréable. Une plus longue fermentation ne peut qu'améliorer la qualité de l'eau-de-vie. En Sardaigne, on distille également deux fois.

C'est ainsi que se pratique en Suisse cette fermentation. Cependant, d'après les indications de M. le Dr V. Grafe, de l'Université de Vienne (Autriche), on utilise dans ce pays (Salzburg, Bavière supérieure et Carinthie) un autre procédé. La racine, fraîchement arrachée est mise en tas et couverte de branchages. Pendant ce temps, le gentianose et les glucosides se dédoublent et la racine se colore en brun. Puis les racines sont coupées en disques et introduites dans des tonneaux pleins d'eau. Après huit jours de fermentation, le tout est distillé.

Mon savant correspondant ajoute qu'il a vu, dans certaines parties du Tyrol, les paysans extraire par l'alcool les principes actifs de la racine après avoir laissé celle-ci en tas un certain temps, comme il est dit plus haut. Cette méthode se pratique notamment à Cortina et à Kitzbühel, dans le Tyrol méridional (teinture).

Les propriétés amères, apéritives, fébrifuges très actives de cette liqueur, la fait très estimer chez les paysans comme remède populaire. En effet, une partie des principes aromatiques est conservée par cette méthode et confère à cette liqueur une très réelle efficacité, surtout contre les coliques intestinales. Malheureusement, comme tout liquide alcoolique, elle est souvent consommée régulièrement par des alcooliques, sous le couvert de ses propriétés thérapeutiques et bienfaisantes !

Il est intéressant de signaler ici que cette plante a donné lieu, plus fréquemment qu'on ne le pense, à des empoisonnements, la plupart suivis d'une issue mortelle. Mattirolo[1] a publié récemment une liste de douze intoxications produites par la confusion de la grande gentiane jaune avec le vératre *(Veratrum album* L.*)*, une Colchicacée contenant des alcaloïdes très violents. Pour un œil non exercé, cette plante présente, en effet, une certaine analogie avec la gentiane, mais en diffère, à première vue, par ses feuilles plissées, alternes, ses fleurs vertes, plus petites et par son type floral.

[1] Mattirolo, Oreste. *Sopra 12 Avvelenamenti per Veratrum album L. Reale Academia della Scienze di Torino*, 1915.

COMPOSITION CHIMIQUE

L'étude chimique de la racine de gentiane a suscité pendant tout le siècle dernier une série de belles recherches.

GLUCOSIDES. — Dès 1819, HENRY[1] d'un côté et GUILLEMIN et JACQUEMIN[2] de l'autre, tentent les premières analyses de cette racine, pour en isoler le principe amer. Celui-ci est un glucoside, la *gentiopicrine*, découverte par KROMAYER[3], en 1862, dans la racine fraîche. Il en étudia la formule : $C^{20}H^{30}O^{12}$ et en fixa la nature glucosidique.

Comme une partie de ce principe est hydrolysée au cours de la dessication de la racine par les ferments hydrolysants que celle-ci contient, BOURQUELOT et HÉRISSEY[4] ont donné une nouvelle méthode de préparation qui consiste à détruire les enzymes par l'alcool bouillant.

Ayant traité vingt-deux kilos de racines fraîches, ils retirèrent 250 grammes de gentiopicrine, tandis que KROMAYER, avec trois kilos, obtient 4 grammes de glucoside.

TANRET[5] qui désirait avoir de notables quantités de gentiopicrine pour des usages cliniques, isola ce principe de l'extrait au moyen d'éther acétique et, du même coup, reconnut l'existence d'un second glucoside qu'il appela *gentiamarine*. En outre, il séparait au moyen de ce solvant les glucosides des hydrates de carbone. Il reconnut une erreur dans la formule de la gentiopicrine donnée par KROMAYER : celle-ci est, d'après cet auteur, $C^{16}H^{20}O^{9}$.

La gentiopicrine est une poudre blanche qui cristallise soit anhydre, soit hydratée avec $\frac{1}{2}H^{2}O$, très amère, soluble dans quatre parties d'eau, dans vingt-trois parties d'alcool à 95°, dans l'éther acétique. La réaction caractéristique de ce corps est la suivante : précipité par le tannin, insoluble dans une solution saturée de sulfate de magnésie.

[1] HENRY. *Journal de Pharmacie et de Chimie* (1819), 2, V, 97.
[2] GUILLEMIN et JACQUEMIN. *Journal de Pharmacie et de Chimie* (1819), 2, V, 110.
[3] KROMAYER. *Arch. der Pharm.* (1862), CX, 27.
LUDWIG et KROMAYER. *Berichte Wiener Akad.* (1862), VL, 149.
[4] BOURQUELOT et HÉRISSEY. *Comptes rendus*, 131, 276.
BOURQUELOT et HÉRISSEY. *Journal de Pharmacie et de Chimie*, 6, 16, 513.
[5] TANRET, G. *Contribution à l'étude de la gentiane*. Thèse de doctorat en médecine. Paris (1905), 15.

Réaction colorée en rouge par l'acide sulfurique dans un mélange de chlorure de zinc et gentiopicrine. TANRET la considère comme une lactone d'un acide gentiopicrinique dont il a pu préparer les sels de potasse et de baryte.

Traitée par les acides dilués ou par de l'émulsine[1], on obtient de la *gentiogénine*, $C^{10}H^{10}O^4$ et du glucose. La gentiogénine est une poudre cristalline blanche, sans amertume, considérée par TANRET[2] comme un alcool tétraatomique.

Le second glucoside de la racine de gentiane, la *gentiamarine*, trouvée comme nous l'avons vu par TANRET, est une poudre amorphe également très amère, soluble dans l'eau et l'alcool. Hydrolysée par l'émulsine, elle donne un corps marron et du glucose. Elle ne possède aucune fonction lactone.

Ce même auteur a décelé un troisième glucoside qu'il appelle la *gentiine*. C'est un corps cristallisé, blanc, colorable par $FeCl^3$, insoluble dans l'eau. Sa formule est $C^{25}H^{28}O^{14}$, mais il est sans fonction lactone. Par hydrolyse, il donne du xylose, de la *gentiénine* (cristaux jaunes) et du glucose[3].

En résumé, on connaît actuellement trois glucosides :

Gentiopicrine $C^{16}H^{20}O^9$ < gentiogénine $C^{10}H^{10}O^4$ / glucose $C^6H^{12}O^6$

Gentiamarine < corps marron / glucose $C^6H^{12}O^6$

Gentiine $C^{25}H^{28}O^{14}$ < gentiénine $C^{14}H^{10}O^5$ / glucose $C^6H^{12}O^6$ Xylose $C^5H^6O^5$

SUCRES. — Cette racine contient un trisaccharide des plus intéressant : le *gentianose* $C^{18}H^{32}O^{16}$, découvert dans la racine fraîche par MEYER[4], en 1881. Sa nature exacte fut révélée par les travaux de BOURQUELOT et ses collaborateurs NARDIN[5] et HÉRISSEY[6]. Ce sucre cristallise en

[1] BOURQUELOT et HÉRISSEY. *Journal de Pharmacie et de Chimie* (1899), IX, 220.
BOURQUELOT et HÉRISSEY. *Journal de Pharmacie et de Chimie* (1902), XVI, 513.
[2] TANRET, G. Thèse, p. 40.
[3] TANRET, G. *Bulletin de la Société de Chimie* (1905), XXXIII, 1059, 1071 et 1073.
TANRET, G. *Comptes rendus* (1905), CXII, 207 et 263.
[4] MEYER, Arthur. *Zeitschr. für physiol. Chem.* (1882), VI, 135.
[5] BOURQUELOT et NARDIN. *Comptes rendus* (1898), I, 280.
BOURQUELOT et NARDIN. *Journal de Pharmacie et de Chimie* (1898), VII, 289.
[6] BOURQUELOT et HÉRISSEY. *Comptes rendus*, CXXVI, 1015 ; CXXII, 571 ; CXXXIII, 690 ; CXXXV, 399
BOURQUELOT et HÉRISSEY. *Annales de Pharmacie et de Chimie* (1902), XXVII, 397
BOURQUELOT et HÉRISSEY. *Journal de Chimie et de Pharmacie* (1903), XVI, 417.

lamelles carrées ou rectangulaires, anhydre; il a une saveur peu sucrée; il est dextrogyre et non réducteur. Par hydrolyse avec de l'acide sulfurique à 3 %, on obtient deux molécules de glucose et une de lévulose :

$$C^{18}H^{32}O^{16} + 2H^2O = \overset{\text{glucose}}{2C^6H^{12}O^6} + \overset{\text{lévulose}}{C^6H^{12}O^6}$$

Ceci est également réalisable par une macération d'*Aspergillus niger*. Mais, par l'action de l'acide sulfurique à 2 % ou par celle de l'invertine de levure, le gentianose donne une molécule d'un disaccharide, le *gentiobiose* $C^{12}H^{22}O^{11}$ et une de lévulose[1].

$$C^{18}H^{32}O^{16} + H^2O = \overset{\text{gentiobiose}}{C^{12}H^{22}O^{11}} + \overset{\text{lévulose}}{C^6H^{12}O^6}$$

Le *gentiobiose* est un sucre très amer cristallisé, réducteur, donnant deux molécules de glucose par dédoublement au moyen d'H^2SO^4, de l'émulsine ou d'une macération d'*Aspergillus*. On le prépare par hydrolyse du gentianose avec une solution d'acide sulfurique à 2 ‰ ou par de la levure agissant par son invertine. Il possède un groupe aldéhydique libre et il est faiblement dextrogyre. Zemplen[2] en a récemment préparé un dérivé acétylé, cristallisable, l'*octoacétylgentiobiose*.

On peut également préparer du gentiobiose avec de l'extrait de gentiane des pharmacies (qui ne contient plus de gentianose) en faisant fermenter la solution aqueuse par de la levure haute qui laisse intact le gentiobiose[3].

Un disaccharide, le *saccharose*, a été extrait de la racine fraîche, mais en faible quantité[4].

Du *glucose* et du *lévulose* ont été également retirés par Bourquelot et Hérissey[5].

La racine fraîche ne contient pas de gentiobiose, mais celui-ci est abondant dans l'extrait du commerce; il se produit au cours de la dessiccation de la racine par l'action hydrolysante de l'invertase qu'elle contient.

[1] Bourquelot, E. *Société de biologie* (1903), LV, 386.
[2] Zemplen, G. *Zeitschr. für physiol. Chem.* (1913), LXXXV, 399 et 407.
[3] Bourquelot et Hérissey. *Journal de Pharmacie*, XVI, 153.
[4] Bourquelot et Hérissey. *Comptes rendus* (1900), II, 750.
[5] Bourquelot et Hérissey. *Journal de Pharmacie et de Chimie* (1902), II, 513.

GENTISINE. — Un autre corps qu'on peut retirer de l'extrait de gentiane par l'éther après élimination des glucosides, est la *gentisine* ou *gentisin*. Ce corps fait partie du complexe *gentianine* d'HENRY et CAVENTOU[1] étudié déjà en 1821. Plus tard, TROMSDORFF[2] ayant repris son étude, en isola des cristaux jaune soufre par l'alcool et l'éther; LECONTE[3], en 1838, les retrouva et leur donna le nom de gentisine. En 1847, BAUMERT[4] fixa leur formule : $C^{14} H^{10} O^5$. Comme ils avaient de faibles propriétés acides, il leur donna le nom d'*acide gentianique*.

Plus tard, HLASIWETZ et HABERMANN[5] ont reconnu la *gentisine* comme dérivé xanthonique qui donne, par fusion alcaline : de la phloroglucine, de l'acide dioxybenzoïque (= acide gentianique de BAUMERT) et de l'acide acétique. Par l'action de l'acide chlorhydrique, on obtient du chlorure de méthyle.

Dans toute une série de belles recherches, KOSTANECKI et ses collaborateurs[6] en établirent la constitution et parvinrent même à en faire la synthèse; ce serait un éther méthylique de la gentiséïne $C^{13} H^{17} O^4 O CH^3$ qui est une 1. 3. 7. trioxyxanthone.

gentiséïne (1. 3. 7 trioxyxanthone). gentisine.

CORPS DIVERS. — **Pectine.** — Les macérations froides de racine de gentiane contiennent une substance mucilagineuse[7]. BOURQUELOT et HÉRISSEY[8] identifièrent cette substance à de la pectine, donnant par hydrolyse de l'arabinose et du galactose. Nous avons constaté qu'elle se trouve en plus grande abondance encore dans les feuilles.

[1] HENRY et CAVENTOU. (1821), VII, 125.
[2] TROMSDORFF. *Ann. Chem.* (1837), XI, 134.
[3] LECONTE. *Ann. Chem.* (1838), XXV, 200.
LECONTE. *Journal de Pharmacie* (1837), 465.
[4] BAUMERT. *Archives de Pharmacie et de Chemie* (1847), LIX, 264.
BAUMERT. *Journal de Pharmacie et de Chimie*, XIII, 51.
[5] HLASIWETZ et HABERMANN. *Lieb. Ann.* (1875), CLXXV, 264; (1876), CLXXX, 343.
HLASIWETZ et HABERMANN. *Ber. Chem. Ges.* (1874), VII, 652.
[6] KOSTANECKI et TAMBOR. *Monatshefte Chem.* (1895), XVI, 919.
TAMBOR *Dissert.* Berne, 1894.
KENNEDY, G. W. *Arch. Pharm.* (1876), CCIIX, 382.
[7] DENIS. *Journal de Pharmacie* (1836), 303.
[8] BOURQUELOT et HÉRISSEY. *Journal de Pharmacie et Chimie*, I (1898), 173.
BOURQUELOT et HÉRISSEY. *Journal de Pharmacie et Chimie*, II, 49 et 145.

Tanin. — PATSCH[1], DAVIES[2] et WILLE[3] prétendent avoir rencontré du tanin dans la racine; il fut appelé acide *gentiano-tanique*. Mais sa présence est contestée par MAISCH[4], VAN ITALLIE[5] et SCHNITZLEIN[6]. Finalement TANRET[7] admet qu'il s'y trouve seulement à l'état de traces.

Essence. — Par distillation aqueuse, on a obtenu une huile blanche, butyreuse, à odeur vireuse et plus ou moins toxique[8].

Il est plus que certain que cette essence trouvée par PLANCHE, donne l'arome spécial qui caractérise la liqueur de gentiane. Cet arome préexiste dans la racine fraîche et en tout cas ne se forme pas pendant la fermentation. Nous nous en sommes convaincus en distillant de la racine fraîche broyée avec de l'eau. Le distillat aqueux avait à un très haut degré l'odeur caractéristique de la liqueur; cependant elle était plus vireuse : en effet, il doit s'ajouter pendant la fermentation tous les éthers aromatiques élaborés par le chimisme de la levure.

Amidon. — Cette racine est réputée chez les pharmacognostes pour son absence d'amidon; cependant FISCHER et HARTWIG en ont trouvé dans un échantillon récolté au mois de novembre.

Monsieur le professeur A. Lendner m'a également communiqué un échantillon de *Gentiana purpurea L.*, d'une provenance inconnue et qui en contenait passablement.

HARTWICH et UHLMANN signalent aussi une graisse analogue à la cholestérine. (5-6 %).

Les cendres composées en majeure partie de carbonate de calcium donnent 8,5 %.

Dans la partie feuillée de la plante — tiges et feuilles — BRIDEL[9] a montré également la présence de gentiopicrine, mais en quantité moindre que dans la racine. Ce même auteur[10] a constaté un fait très intéressant : les hydrates de carbone varient au cours de l'année dans leur teneur, tandis que les glucosides restent en proportions presque

[1] PATSCH. *Amer. Journ. Pharm.* CCX (1877), 91.
PATSCH. *Amer. Journ. Pharm.* VI (1878), 188.
[2] DAVIES. *Pharm. Journ. Trans.* CCCCLXXXII, 230.
[3] WILLE. *Journal de Pharmacie.* (1877), 118.
[4] MAISCH *Amer. Journ. Pharm.* (1876), VI, 117.
[5] VAN ITALLIE. *Arch. Pharm.* (1888), CCXXVI, 311.
[6] SCHNITZLEIN. *Jahrb. für Pharm.* (1862), 33.
[7] TANRET, G. *Thèse*, 71 et 72.
PLANCHE. *Bulletin de Pharmacie* (1814), VI, 551.
[8] *Comm. zu Arzneibuch f. d. Deutsch. Reich. Ergänzungsband* (1901), 230.
[9] BRIDEL Marc. *Thèse de Paris* (1913), 31.
[10] BRIDEL Marc. *Thèse de Paris*. 113.

fixes, soit 2 % pour la gentiopicrine. Par conséquent, les hydrates de carbone doivent être rangés parmi les substances de réserve de cette plante.

On voit ainsi que, malgré plusieurs inconnues qui subsistent, cette plante est assez bien connue au point de vue chimique.

LES ENZYMES

La science des ferments s'est tellement développée ces dernières années, qu'il devient absolument indispensable, lorsqu'on étudie une plante, de connaître les enzymes qu'elle renferme. En effet ceux-ci jouent un rôle tel, qu'ils expliquent mainte réaction qui se passe à l'intérieur de l'organisme et qui permet à la plante d'utiliser ou d'insolubiliser des réserves nutritives, d'oxyder ou de disloquer certains produits toxiques.

Aussi avant d'étudier la fermentation de la racine de gentiane, il était nécessaire de fixer sa richesse en enzymes.

Nous avons fait tous les essais sur les racines et pour certains nous avons étendu ces recherches à toute la plante.

Catalase

La catalase est un ferment dislocant connu depuis longtemps par son pouvoir de décomposer l'eau oxygénée. Cette propriété a été utilisée pour le reconnaître et également pour le doser, puisque dans cette réaction il se forme de l'oxygène moléculaire, dosable par le volume que celui-ci occupe.

Essai qualitatif. — 1° *Dans la racine.* On a procédé de la manière suivante : quelques grammes de racine très fraîche sont broyés finement ; on extrait le suc qu'on introduit dans un eudiomètre. On ajoute 10 cm³ d'eau oxygénée à 1 %.

Aucun dégagement d'oxygène n'a été constaté.

Résultat : Il n'existe donc pas de catalase dans la racine. Or, on sait que parmi d'autres fonctions, ce ferment peut décomposer le peroxyde d'hydrogène qui se formerait dans la photosynthèse. On comprend donc que cet enzyme n'existe pas dans ces racines très longues, qui sont des organes souterrains sans tissu palissadique chlorophyllien et soustraits à l'action de la lumière.

2° *Dans les feuilles.* — 1,0 gr. de feuilles très fraîches sont broyées finement ; le tout est placé dans un eudiomètre ; on y ajoute 10 cm³ d'eau oxygénée à 1 %.

Deux essais sont effectués :

	Temps en minutes :	cm³ d'O² dégagé :
Premier essai :	1	2,6
	2	5,2
	4	6,2
Deuxième essai :	1	3,0
	2	5,0
	4	5,8

Résultat : Les feuilles contiennent des quantités normales de catalase et analogues aux quantités trouvées dans des feuilles d'autres plantes (Comparer thèse de FREEDERICKSZ [1]).

Amylase

L'amylase est un ferment hydrolysant de l'amidon, substance de réserve. Elle abonde dans les organes des plantes où s'accumulent des produits nutritifs amylacés. Les racines jouent souvent ce rôle et sont en général pourvues de ce ferment.

Essai qualitatif. — On prépare une solution d'amidon au 1/10. On ajoute 5 cm³ de suc de racines, fraîchement préparé. Le tout est porté dans un thermostat à 30°. Au bout de 12 heures, on ajoute une goutte de solution iodo-iodurée. Aucune coloration bleue ne se produit, ce qui indique que l'amidon a été saccharifié. Dans le tube témoin, auquel on avait supprimé le suc de plante, apparaît une coloration bleue.

Le premier essai qualitatif ayant donné une réaction positive pour la racine et les feuilles, nous avons alors effectué le dosage de la façon suivante :

On prépare d'une part du suc de feuilles, d'autre part celui de la racine, en broyant une partie de substance, avec une partie d'eau. Dans la première éprouvette, on met 1 cm³ de solution de ferment et dans les neuf autres 1 cm³ d'eau et 3 cm³ de solution d'amidon à 1 %. Ensuite on verse le contenu de la première éprouvette dans la seconde, on agite et on dilue ainsi de suite de 50 % dans chacune des éprouvettes suivantes. On laisse agir 24 heures à 34°. Au bout de ce temps, on ajoute dans chaque éprouvette une goutte de solution n/10 d'iode. On remarque alors les colorations suivantes :

[1] FREEDERICKSZ W. *Bulletin de la Société Botanique de Genève*, III (1911), 80.

Éprouvettes avec suc de feuilles :		Éprouvettes avec suc de racines :	
1.	—	1.	—
2.	incolore	2.	incolore
3.	»	3.	»
4.	rouge vineux	4.	rouge vineux
5.	bleu	5.	bleu
6.	»	6.	»
7.	»	7.	»
8.	»	8.	»

Résultat : La quantité d'amylase est identique dans les feuilles et la racine. Sa proportion est très notable et explique l'impossibilité de la formation de l'amidon ; or en pharmacognosie cette racine est réputée par son absence d'amidon, ce qui est un bon caractère pour la reconnaître.

Oxydase

Une tranche de racine fraîche est appliquée sur un papier buvard imbibé de teinture de gaïac émulsionnée et fraîchement préparée. Au bout de quelques minutes on constate un bleuissement rapide du papier et correspondant surtout à la région corticale.

Résultat : Présence d'oxydase. L'acide pyrogallique ne nous donne pas de précipité net, ce qui correspond à une faible quantité de ferment.

Peroxydase

Tanret[1] a mis en évidence sur une gentiane d'octobre une peroxydase. Nos essais n'ont pas été concluants à ce sujet.

Tyrosinase

Comme précédemment, la racine est broyée avec une quantité égale d'eau. Quatre essais différents sont effectués au moyen du réactif crésol-azur :

N° 1.	2 cm³ de suc +	3 cm³ glycocolle +	1 cm³ p. crésol
N° 2.	»	»	
N° 3.	»	neutralisé	
N° 4.	»	acide (acidité naturelle)	

Dans les quatre essais il n'y a aucune coloration.

Résultat : Absence de tyrosinase.

[1] Tanret G. *Thèse Paris.*

Emulsine

0,2 gr. d'amygdaline sont dissous dans 10,0 gr. d'eau. On ajoute 2 cm³ de suc de racine. Après 24 heures le papier picrosodique de Guignard n'a pas rougi.

Résultat : Absence d'émulsine. Ceci montre que le gentiobiose, s'il existe dans la plante, doit être attaqué par un ferment spécifique, la gentiobiase, Bourquelot[1] ayant montré — *in vitro* — que l'émulsine attaque le gentiobiose et que l'invertine est sans action sur ce sucre. En outre la présence de gentiobiose dans la plante vivante a été mise en doute par Bourquelot.

Sucrase

On dissout 0,5 de saccharose dans 10,0 gr. d'eau. On ajoute 2 cm³ de suc. Le tout est porté au thermostat à 35° pendant 6 heures. La liqueur de Fehling est fortement réduite.

Pour vérifier la présence de cet enzyme nous avons fait les essais suivants :

N° 1.	Pour réduire 2,5 cm³ Fehling,			empl. *23 cm³*	suc frais bouilli.	
N° 2.	»	»	»	*18 cm³*	»	laissé 48 heures.
N° 3.	»	»	»	*12 cm³*	»	laissé 48 heures avec sucrase.

Deuxième essai comparatif :

N° 1.	Suc frais bouilli		empl.	*16 cm³*
N° 2.	»	» 48 heures	»	*12 cm³*
N° 3.	»	» + sucrase	»	*9 cm³*

Résultat : Il y a passablement de sucrase, celle-ci, comme on l'a vu, agit sur le gentianose et le dédouble en gentiobiose et lévulose.

Gentianase

La présence d'un ferment spécifique appelé *gentianase* n'est pas absolument certaine ; car on a vu que l'invertine agit sur le gentianose.

Gentiobiase

Le disaccharide gentiobiose par sa nature spéciale doit être attaqué selon Bourquelot par la gentiobiase qui le dédouble en deux molécules de glucose.

[1] Bourquelot et Hérissey. *C. R. Ac. Sc.* CXXXV (1902), 399 et 401.

Pour terminer, il y a quelque intérêt à signaler les expériences de Barthet et Thierry[1]; ces auteurs ont trouvé que le suc pancréatique du chien, les macérations des muqueuses intestinales de lapin ou de chiens n'hydrolysent pas le gentianose; tandis que les Mollusques et les Crustacés ont une enzyme dédoublant le gentianose en lévulose et gentiobiose.

Conclusion : Il est certain que plusieurs de ces ferments, abondants dans cette racine, prennent une part active dans la dégradation des sucres complexes en produits plus simples qui sont ensuite repris et transformés par les levures en alcool.

[1] Barthet G. et Thierry H. *C. Rend. Soc. Biol.* I. (1908), 651.

LA FERMENTATION

On a vu au début de ce travail combien d'organismes différents pullulent dans un liquide en fermentation ; les bactéries, les Mucorinées, les moisissures, les levures, les *Fungi imperfecti* se partagent le travail en vivant côte à côte. Recenser tous ces végétaux, les déterminer, fixer leur rendement en alcool, tel est le but de ce chapitre.

Obtention des levures. — Nous avons prélevé à trois époques différentes, dans les mois de septembre à décembre, des échantillons de moût de gentiane en fermentation. Les prises provenaient de trois endroits différents dans le Jura bernois.

Il est inutile de rappeler que toutes les précautions ont été prises pour aseptiser le matériel et éviter une pénétration de germes étrangers. Les prises d'échantillons ont été faites de trois manières : 1° on a prélevé un échantillon de l'écume qui s'accumule à la surface du liquide ; 2° une autre prise a été effectuée dans le liquide ; 3° on a prélevé des fragments de racines.

Ce procédé a été répété dans les trois endroits différents.

C'est évidemment l'échantillon n° 1 qui a donné le maximum d'organismes. Il s'est cependant trouvé que les trois parties contenaient la même flore.

Sitôt reçus au laboratoire, les liquides ont été revivifiés par adjonction de moût de vin stérilisé. Au bout de quelques heures, la fermentation était déjà très active et après un jour les organismes ont été triés d'abord par dilution. Le moût de gentiane ayant une réaction acide, excluait la présence de bactéries, ce qui a beaucoup facilité les triages.

Pour effectuer ces derniers, on prépare des milieux de moût gélatinisé qu'on ramollit à une douce chaleur. On introduit alors quelques gouttes de moût de gentiane dilué convenablement dans de l'eau stérile.

Au bout de quelques jours, les colonies sont suffisamment développées pour que leur aspect extérieur permette de faire un premier choix. De cette façon nous avons repiqué 52 colonies. Sur ce nombre, onze levures paraissaient différer des autres par leur morphologie extérieure. Nous les avons triées à nouveau, pour en isoler des races pures à partir d'une cellule unique d'après la méthode décrite par Hansen.

A côté de ces onze levures, nous avons abondamment rencontré une *Mucédinée* du genre *Oidium*.

Classification. — La taxinomie des levures est encore peu avancée ; bon nombre d'espèces sont mal ou insuffisamment décrites. Aussi ce n'est pas sans peine qu'on arrive à établir l'identité d'une levure. Pour simplifier ce travail nous avons composé une clef dichotomique des genres décrits jusqu'ici ; nous la publions, pensant qu'elle pourra peut-être rendre quelques services.

Table dichotomique pour la Détermination des Genres de Levures

1. Levure sporulant..... 2
   Levure sans sporulation..... 15
2. Levure se multipliant par cloisonnement. *Schizosaccharomyces*
   » » par bourgeonnement..... 3
3. » à sexualité précédant la sporulation..... 4
   » sans » » » 8
4. Copulation à l'état de vestige..... 5
   » toujours nette..... 6
5. Ascospores entourées d'un filet saillant. *Schwanniomyces*
   » sans » » *Torulaspora*
6. Copulation entre deux cellules voisines. *Guillermondia*
   » » étrangères..... 7
7. Ascospores lisses. Copulation..... *Zygosaccharomyces*
   » verruqueuses. » ..... *Debaryomyces*
8. Levures à ascospores fusiformes ou linéaires..... 9
   » » rondes à ovales, anguleuses, en citron ou en chapeau..... 10
9. Asques à 1 ascospore..... *Monospora*
   » à 8 » fusiformes à 1 cil. *Nematospora*
10. Levure formant immédiatement un voile..... 11
    » ne » pas » » 12
11. Ascospores sphériques ou anguleuses.. *Pichia*
    » en citron ou chapeau melon *Willia*
12. Levure se multipliant tantôt par cloisons tantôt par bourgeonnement..... *Saccharomycodes*
    Levure ne se multipliant que par bourgeons..... 13
13. Cellules apiculées et toujours à 1 spore. *Hansenia*
    » non » ayant 1-8 spores (ou apiculées mais à plusieurs spores)..... 14
14. Ascospores à 2 membranes..... *Saccharomycopsis*

» 1 » ..... *Saccharomyces*

15. Levures parasites, pathogènes..... *Cryptococcus*

» non » ni »..... 16

16. Forment un voile immédiat, cellules allongées ..... *Mycoderma*

Forment un voile immédiat ou après fermentation, cellules ovales ou rondes *Torula*

Comme critérium d'identification spécifique, nous nous sommes astreint pour chaque levure, à fixer les données suivantes :

1. Forme et aspect d'une jeune colonie. Mêmes recherches pour les colonies géantes.

2. Forme des cellules jeunes de un à deux jours. Dimensions.

3. Inoculation dans des milieux liquides. Examen de la forme des cellules, de l'apparence de la végétation, soit formation d'un voile, d'un dépôt, etc.

4. Inoculation sur carotte et sur plâtre pour étudier la sporulation.

5. Fermentation d'un moût de vin, pour le dosage de l'alcool.

6. Action de la levure sur les mono, di, trisaccharides.

Avec ces documents, on peut alors tenter la détermination par voie d'élimination.

ÉNUMÉRATION DES ORGANISMES

Nous donnons maintenant la liste, avec description suivant les principes qui précèdent, des champignons triés dans cette fermentation.

Oidium gentianæ nov. sp.

Champignon formant un court mycelium blanc, de 2 à 3 centimètres de haut. Au bout de huit jours sur moût gélatinisé, une piqûre donne une colonie montrant des zones plus denses partant du centre en lignes courbes.

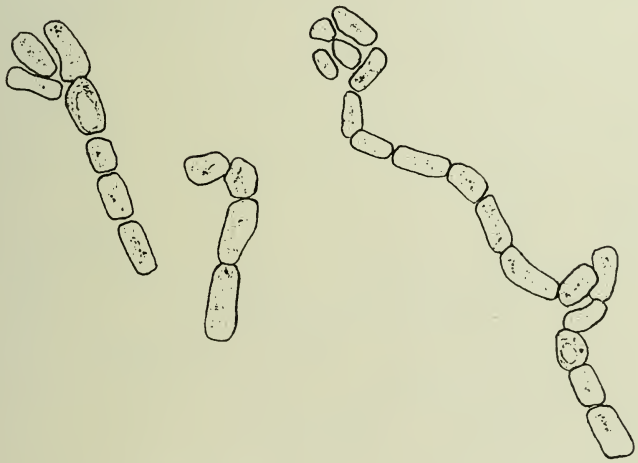

Fig. II. — *Oidium gentianæ*. Jeunes cellules (Chambre humide).

Filaments mycéliens formés de très longues cellules oïdiennes soudées en chaîne. Longueur 4,5 à 17,5 μ; largeur 5-11 μ. Contenu hyalin assez fortement granuleux.

Cultivé sur carotte ne donne pas de spores, mais se vacuolise fortement.

Dans du vin désalcoolisé additionné de 2 % de glucose, les cellules s'arrondissent. Au bout de deux jours à 22° apparaît un voile uni, gris, mat, plus ou moins farineux.

Rendement en alcool : 0

Dans les vieilles cultures, formation de chlamydospores caractéristiques.

Ces caractères qui précèdent en font un *Oidium*. Il s'est trouvé constamment dans tous les triages, quoiqu'il n'ait aucune importance dans la production d'alcool.

Fig. III. — *Oidium gentianæ*. Aspect des cellules dans les milieux liquides (20 jours).

Oidium gentianæ. Guyot, nov. sp.

Cellulæ elongatæ, oidium revocantes, in catenam conjunctæ 4,5-17,5 μ lg. et 5-11 μ lat. Mycelium fungi in gelatina cultum zonas densiores a centro divergentes exhibens. In vino saccharato cultum velum planum griseo farinosum figurans. Cellulæ in liquido vigentes rotundatæ. In culturis senescentibus chlamydosporæ frequentes.

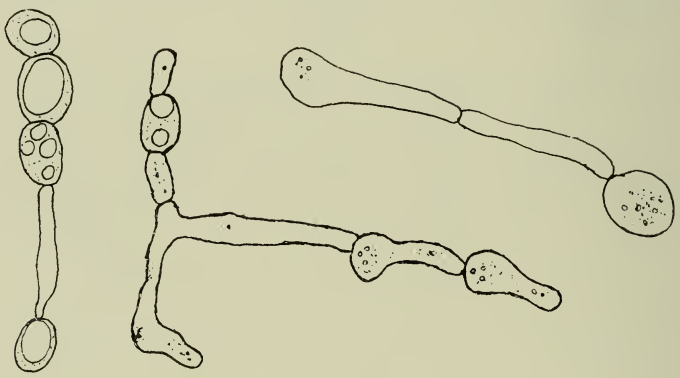

Fig. IV. — *Oidium gentianæ*. Formation de chlamydospores dans une vieille culture.

Zygosaccharomyces Chodati nov. sp.

Jeunes colonies croissant en hauteur, fortement ridées, de couleur crème, à sommet en cratère jaunâtre.

Cellules allongées, triangulaires au sommet, munies presque toujours de petites aspérités latéralement. Cellules bourgeonnantes assez souvent de deux types différents; les unes sont plus ou moins quadrangulaires, longues de 5 à 20 μ et larges de 5 μ; les autres sont ovales, longues de 5 à 12,5 μ, larges de 5 μ.

Dans les milieux liquides, cette levure ne forme pas de voile, mais rapidement un dépôt uniforme.

Cultivée sur carotte elle forme facilement des spores, au nombre de une à six spores par asque; elles sont disposées en tétrades ou en chaînes; d'autres fois elles sont disposées tout à fait irrégulièrement. On remarque qu'une partie seulement du plasma sert à la formation des spores dans une cellule; cette dernière peut prendre une forme tout à fait irrégulière. On peut remarquer en outre qu'entre deux cellules voisines, il y aurait soudure des deux masses plasmiques, par conséquent pédogamie. Ce phénomène nous montre une parenté avec le genre *Guillermondia* de Nadson[1]. Mais ce qui différencie cette levure, c'est la forme tout à fait variable de l'asque, qui prend des allures plus ou moins amiboïdes.

Fig. V. — *Zygosaccharomyces Chodati*. Jeunes cellules.

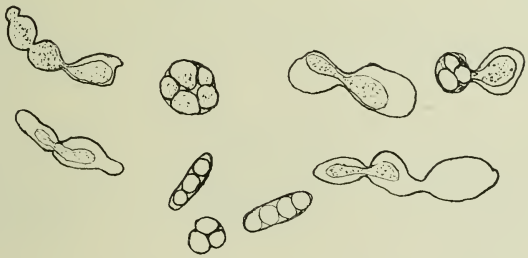

Fig. VI. — *Zygosaccharomyces Chodati*. Copulation et différentes formations de spores.

Dans les cellules ovales on ne remarque aucune copulation et la formation des ascospores paraît normale, quoiqu'on constate de temps en temps deux grosses ascospores, puis deux plus petites sûrement avortées.

Ces faits montrent qu'il y a une copulation, ce qui fait rentrer cette levure dans le genre *Zygosaccharomyces*. C'est une espèce nouvelle bien définie, d'abord par ses cellules à pourtour anguleux et par ses asques

[1] Nadson et Konokotine. *Travaux de l'Ecole supérieure de Médecine des femmes de Pétrograde* (1912).

amœbiformes. Il diffère du *Z. Barkeri* (Barker) Sacc. qui a des cellules ovales, du *Z. Priorianus,* Klöck. et *japonicus,* Saito, parce qu'il fermente le saccharose, disaccharide non attaqué par ces derniers.

C'est avec un vif plaisir que nous dédions cette nouvelle espèce à notre professeur M. R. Chodat.

Introduit dans le moût de vin stérilisé, il provoque une active fermentation qui donne 8,18 % d'alcool en volume. Le distillat possède une agréable odeur de cognac.

Fig. VII. – *Zygosaccharomyces Chodati.* Différents stades de la sporulation.

Sucres fermentés :

Monosaccharides :	**Disaccharides :**	**Trisaccharides :**
Glucose	Saccharose	Raffinose
Fructose		
Galactose		

C'est donc une excellente levure pour la fermentation de la gentiane.

Zygosaccharomyces Chodati, Guyot, nov. sp.

Cellulæ elongatæ, apice angulosæ, lateraliter asperæ subquadrangulares vel ovales.

Crassamentum in liquido uniforme. Sporæ 1 ad 6 in catenam vel tetrædrice dispositæ.

Saccharomyces sp.

Jeune colonie croissant en hauteur, blanc crème, à pourtour sinueux. Quelques forts sillons partent du sommet jusqu'à la base,

tandis qu'on distingue de fines stries circulairement. Le sommet est lisse et jaunâtre.

Les jeunes cellules ont une forme arrondie ou ovale ; leur longueur est de 5 à 7,5 μ ; la largeur de 5 à 6,5 μ.

Dans les milieux liquides, elle ne forme pas de voile, même après plusieurs mois, mais un dépôt uni.

Cultivée sur carotte, elle forme des spores groupés en tétrades dans l'ascospore.

Fig. VIII. — *Saccharomyces sp.* — Jeunes cellules.

Fig. IX. — *Saccharomyces sp.* Formation des spores.

Fig. X. — *Saccharomyces sp.* Colonie.

Elle fait fermenter le moût de vin ; par distillation on obtient 8,18 % d'alcool en volume, accompagné d'éthers d'odeur agréable.

Sucres fermentés :

Monosaccharides :	Disaccharides :	Trisaccharides :
Glucose	Saccharose	Raffinose
Fructose	Maltose	
Galactose		

Cette levure rentre donc dans le premier sous-groupe des *Saccharomyces* de Hansen. Mais devant le très grand nombre d'espèces décrites, et cela souvent d'une façon trop sommaire, nous renonçons à identifier cette levure.

Saccharomyces Zopfii Artari

Colonies jeunes, arrondies, finement striées, jaunes. Colonies géantes liquéfiant la gélatine au bout d'un mois et demi.

Cellules rondes ou ovales, bourgeonnantes. Longueur 2,5 à 6 μ ; largeur 2,5 à 5 μ.

Sur les milieux liquides, cette levure ne forme pas de voile, mais un dépôt uni.

Fig. XI. — *Saccharomyces Zopfii.* Jeunes cellules.

Fig. XII. — *Saccharomyces Zopfii* Artari. Déhiscence de l'asque.

Cultivée sur carotte, elle forme facilement des ascospores en tétrades. L'émission des spores se fait par gélification de la membrane de l'asque.

Dans le moût de vin, elle produit une fermentation donnant 8,18 % d'alcool en volume. Il s'y trouve également des éthers à odeur agréable.

Sucres fermentés :

Monosaccharides :	Disaccharides :	Trisaccharides :
Glucose	Saccharose	Raffinose
Fructose		
Galactose		

Elle rentre donc dans le deuxième sous-groupe de Hansen et correspond assez bien à la description du *Saccharomyces Zopfii* d'Artari[1].

Saccharomyces Lendneri nov. sp.

Colonies arrondies, presque lisses, finement striées, luisantes. Après deux mois elles liquéfient la gélatine.

Fig. XIII. — *Saccharomyces Lendneri.* Jeunes cellules.

Fig. XIV. — *Saccharomyces Lendneri.* Emission des spores.

Cellules arrondies ou faiblement ovales souvent vacuolisées. Longueur 3 à 6 μ; largeur 2,5 à 5 μ.

Dans les milieux liquides, il ne se forme aucun voile même après deux mois. Le dépôt est abondant et pulvérulent.

Sur carotte, cette levure sporule. Les spores sont groupées en tétrades et l'émission se fait par le sommet de l'asque.

Par fermentation du moût de vin on obtient 7,74 % d'alcool en volume.

Les trois monosaccharides suivants sont seuls fermentés : glucose, fructose, galactose.

[1] Artari, A. *Abhandl. d. naturf. Ges. zu Halle*, XXI (1897).

Comme les deux *Saccharomyces* qui suivent, celui-ci se range dans le quatrième sous-groupe de Hansen. Il ne correspond à aucun des deux décrits jusqu'ici, soit le *S. Mali Duclauxi* Kayser[1] et *S. unisporus*

Fig. XV. — *Saccharomyces Lendneri.* Colonie.

Jörgensen[2]. Il diffère surtout des deux suivants par le mode de rupture de l'asque. Nous avons le plaisir de le dédier à M. le professeur Dr A. Lendner en signe de reconnaissance.

Saccharomyces Lendneri, Guyot, nov. sp.

Cellulæ rotundatæ, vel plus minus ovales. Coloniæ læves, politæ, læviter striatæ. Depositum i. e. crassamentum in liquido uniforme.

Sporæ tetrædrice dispositæ ruptura asci apicis liberatæ.

Saccharomyces gentianæ nov. sp.

Colonie jeune, blanche, finement striée, à stries profondes partant du sommet jusqu'à la base.

Cellules rondes, elliptiques, ayant une longueur de 5 à 7 μ et pour largeur 5 à 6 μ.

Dans les milieux liquides, cette levure ne forme pas de voile, même après deux mois. Le dépôt est lisse.

Fig. XVI — *Saccharomyces gentianæ.* Cellules jeunes.

Fig. XVII. — *Saccharomyces gentianæ.* Déhiscence de l'asque.

Ensemencée sur carotte, elle sporule facilement; les spores sont groupées en tétrades. L'émission des spores se fait par gélification de la membrane.

[1] Kayser, E. *Ann. Inst. Past.* IV (1890).
[2] Jörgensen A. *Centr. f. Bakt.* I, 2 (1896).

Le rendement en alcool est de 7,74 % en volume ; il est accompagné d'éthers.

Comme la levure précédente, celle-ci ne fermente que les trois monosaccharides suivants : glucose, fructose, galactose.

Les spores dans cette espèce étant mises en liberté par un autre mode que celui du *Saccharomyces Lendneri*, nous en avons fait une nouvelle unité.

Saccharomyces gentianæ, Guyot, nov. sp.

A *Saccharomyce Lendneri* Guyot sporis membrana liquefacta evanescente liberatis differt.

Saccharomyces juillardensis nov. sp.

Jeunes colonies croissant en hauteur, jaunâtres, à fortes stries longitudinales. Pourtour irrégulier.

Cellules rondes ou ovales longues de 5 à 6 μ et larges de 2,5 à 5 μ.

Il ne se forme pas de voile même après plusieurs mois, mais un dépôt uniforme.

Cultivée sur carotte, on obtient une sporulation abondante ; les spores sont en tétrades et l'émission se fait d'une manière tout à fait caractéristique par désarticulation transversale de l'asque (fig. 19). Ce mode de

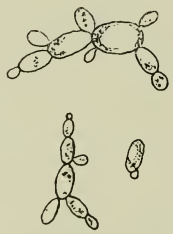

Fig. XVIII. — *Saccharomyces juillardensis.* Jeunes cellules.

Fig. XIX. — *Saccharomyces juillardensis.* Déhiscence transversale de l'asque.

rupture est très particulier et mérite d'être relevé, car il peut servir à différencier cette espèce des autres.

Elle fermente le moût de vin en donnant 8,18 % d'alcool en volume, avec des éthers.

Les sucres suivants sont attaqués : glucose, fructose, galactose.

Cette levure appartient au quatrième sous-groupe de Hansen et constitue une nouvelle espèce, comparée aux deux précédentes.

Saccharomyces juillardensis Guyot, nov. sp.

A *Saccharomyce gentianæ* Guyot ruptura asci transversali differt. — Hab. in loco dicto « La Juillarde » Mons Juræ Bernensi 1100 m.

Pichia gentianæ nov. sp.

Jeunes colonies croissant en hauteur, hémisphériques, faiblement ridées, farineuses, blanc crème à sommet jaunâtre. Colonies géantes aplaties, possédant au centre un faible mamelon ; le bord en est frangé et la colonie devient brunâtre.

Les cellules sont rondes ou ovales et bourgeonnent fréquemment ; longueur 3 à 12 μ ; largeur 3 à 5 μ.

Introduite dans des milieux liquides, cette levure donne au bout de deux jours un voile mat, plus ou moins farineux et qui tombe assez facilement au fond du flacon en plaques. Les recherches pour la température maximale de sa formation nous ont donné les résultats suivants :

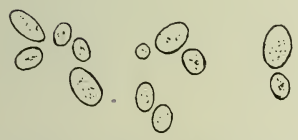

Fig. XX. — *Pichia gentianæ*. Cellules du voile.

Fig. XXI. — *Pichia gentianæ*. Jeunes cellules.

Température	35°	après 2 jours	voile	*très fort*
»	37°	»	»	*fort*
»	42°	»	»	*nul*

La température limite maximale doit donc être comprise entre 38° et 40°.

Les cellules du voile s'allongent beaucoup et bourgeonnent très activement.

Si on cultive cette levure sur milieux de plâtre ou carotte, on obtient au bout d'un assez long temps des spores en tétrades.

La fermentation est peu active ; seuls les trois monosaccharides suivants sont attaqués : glucose, fructose, galactose.

Le rendement en alcool est de 3,6 % en volume.

Cette levure sporulant et formant immédiatement dans les milieux liquides un voile, se rattache au genre *Pichia*. Par les caractères qui précèdent, elle ne correspond à aucune espèce décrite jusqu'ici et constitue ainsi une nouveauté.

Pichia gentianæ, Guyot. nov. sp.

Cellulæ rotundatæ vel ovales. Velum album, farinosum — in liquido nutritivo membranæfaciens.

Pichia farinosa Lindner

Les jeunes colonies de cette levure sont de forme conique, fortement ridées, à contour sinueux, blanches à sommet crème.

Les colonies géantes par contre s'entourent d'une zone grise pulvérulente, mycélienne. En outre toute la colonie tend à s'aplatir.

Les jeunes cellules sont ovales et bourgeonnent facilement ; leur longueur est de 7 μ et la largeur 4,5 à 7 μ.

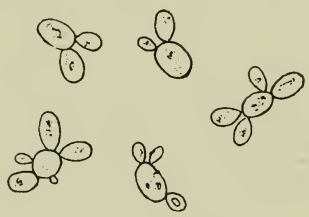

Fig. XXII. — *Pichia farinosa* Lind. Jeunes cellules.

Dans les milieux liquides, on observe au bout de deux jours un voile, qui dans ce cas est fortement plissé, pulvérulent. Au bout de quelques semaines, il se dépose au fond du flacon sous forme de squames. Examinées au microscope, les cellules du voile sont beaucoup plus allongées et ont un plasma fortement vacuolisé (fig. 23).

La température limite maximale de la formation de ce voile est donnée dans le tableau suivant :

Température 35°, après 2 jours il existe un voile.

Température 37°, après 2 jours il existe un voile.

Température 42°, après 2 jours absence de voile.

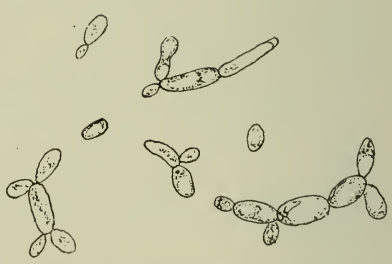

Fig. XXIII. — *Pichia farinosa* Lind. Cellules du voile.

On obtient facilement des ascospores en cultivant cette levure sur carotte ; elles sont groupées en tétrades. L'asque se désarticule en deux moitiés pour l'émission des spores. On n'observe pas de spores dans les cellules du voile. Le pouvoir fermentescible de cette levure est faible ; elle donne 5,39 % d'alcool en volume ; le distillat a une odeur prononcée d'acide formique.

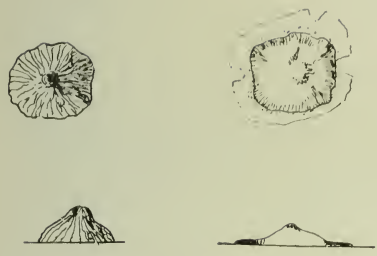

Fig. XXIV.— *Pichia farinosa* Lind. Colonie jeune à gauche et colonie géante à droite.

Le glucose et le fructose sont attaqués par cette levure.

Les caractères précédents la font ranger dans le genre *Pichia*. Elle diffère de la précédente par son voile plissé et par son action nulle sur le galactose. Elle correspond assez bien à la description du *Pichia farinosa* de Lindner [1].

Pichia juratensis nov. sp.

Les colonies jeunes de cette levure ont un bord circulaire, à marge plane; elles sont blanches, farineuses, puis s'élèvent brusquement en colonie hémisphérique.

Dans les milieux solides, les cellules jeunes ont une forme ovale; leur longueur est de 3,5 à 5 μ et leur largeur de 3 à 7 μ, à plasma assez fortement granuleux.

Sur le moût de vin stérile, elle donne au bout de deux à trois jours un voile mat farineux, blanc grisâtre.

Cultivée à différentes températures on obtient la limite entre 38° et 40°.

35°	après deux jours :		*voile fort*
37°	»	»	*moyen*
42°	»	»	*nul*

Sur carotte ou plâtre, on obtient des spores en tétrades. La déhiscence de l'asque s'opère par la partie médiane. On trouve quelquefois des cellules durables.

Cette levure donne 6,55 % d'alcool en volume et fait fermenter le glucose et fructose.

Elle appartient également au genre *Pichia* mais diffère de la précédente par son voile mat et la forme de la colonie. Les autres caractères ne permettent pas de l'identifier avec les espèces déjà décrites.

Pichia juratensis, Guyot, nov. sp.

Cellulæ ovales. Velum album, farinosum. Sporæ tetrædrice dispositæ ascis medio dehiscentibus. Cellulæ perennantes haud raræ.

[1] Lindner. P. *Wochenschrift für Brau.* (1893).

Torula gentianæ, Guyot, nom. nov. (= Torula n° 15, Will.)

Les colonies jeunes de cette levure sont presque planes, lisses, arrondies, grises-blanches, avec un liseré blanc sur le bord ; au bout d'un certain temps celui-ci devient gris et le centre de la colonie se teinte légèrement de jaune. Après un mois, toute la colonie, sauf le liseré s'enfonce par liquéfaction de la gélatine.

Les cellules sont ovales ; plusieurs bourgeonnent. Leur longueur est de 3 à 11 μ et la largeur 3,5 μ.

Fig. XXV.— *Torula gentianæ*. Jeunes cellules.

Fig XXVI. — *Torula gentianæ*. Cellules du voile.

Ensemencées dans du vin désalcoolisé et glucosé, il se forme après deux jours un voile mat, blanc gris, légèrement farineux. Puis au bout de quatre jours, il se ride très légèrement. Les cellules du voile sont plus allongées que celles des colonies des milieux solides.

Fig. XXVII. — *Torula gentianæ*. Jeune colonie et colonie géante en bas.

D'après le tableau suivant, la température limite maximale de formation du voile est environ de 35°.

35°	après deux jours	taches séparées.
37°	»	rien.

On n'obtient aucune formation de spores ni sur carottes ni sur plâtre.

Cette levure fermente très mal le moût de vin ; celui-ci distillé après deux mois donne 1,73 % d'alcool en volume ; le distillat a une forte odeur butyrique.

Aucun sucre n'est hydrolisé par cette levure.

Comme on le voit par cette description, cette levure se rattache au genre *Torula* par l'absence de spores, le voile et sa résistance vis-à-vis des sucres. Elle correspond bien à la courte description de la Torule

n° 15 de Will[1]. Le manque de description suffisante nous engage à lui donner un nom d'espèce.

Torula gentianæ, Guyot. (Torula n° 15 Will, nomen nudum).

Cellulæ ovales, lg. 3-11 μ, lat. 3,5 μ.

Colonia plana, polita, griseo-alba, albo-marginata. Velum planum farinosum. Mense dilapso, gelatinam liquefaciens.

Le bilan de cette fermentation nous donne donc un total de onze organismes différents dont huit sont nouveaux ou que nous avons donnés comme inédits parce qu'ils étaient mal décrits jusqu'ici. Il faut remarquer que trois levures fermentent le raffinose et quatre le saccharose. Or comme nous avons vu que l'invertine attaque le gentianose, il est donc intéressant de voir qu'à côté de l'invertine de la racine, ces levures peuvent continuer d'achever la dégradation de ces sucres. Les autres levures fermentant, les unes les disaccharides, les autres les monosaccharides, doivent également prendre une part active dans l'hydrolyse. Plusieurs donnent dans la fermentation du moût des éthers aromatiques qui se joignent à l'arome *sui generis* de la racine, communiquant ainsi à la liqueur son odeur fortement aromatique.

La présence de l'*Oidium gentianæ* dans les trois échantillons de moût que nous avons utilisés, fait supposer que cet organisme a une fonction réelle; il est plus que probable qu'il empêche la formation d'acide acétique en absorbant l'oxygène. Son rôle serait donc protecteur.

Les *Pichia* fabriquent moins d'alcool que les autres levures, mais en revanche élaborent des éthers.

Toutes ces levures, sauf le *Torula gentianæ*, fermentent le glucose et le fructose. Le galactose est fermenté par huit d'entre elles, ce qui en général chez les levures est plutôt rare.

Tandis que les monosaccharides sont presque tous attaqués par ces levures, les disaccharides résistent passablement; ainsi le sucrose n'est hydrolisé que par quatre levures, le maltose par une seule et le lactose n'est transformé dans aucun cas.

Cette fermentation contient donc tous les organismes nécessaires pour une fermentation complète et riche en production d'alcool.

Le tableau suivant démontre bien ce fait :

[1] Will, H. *Zeitschr. f. d. Ges. Braur.*, XXVI (1903); LXXX (1907); XVII (1907). Will, H. *Centralbl. f. Bakt.*, XXI (1908).

		% d'alcool en volume
Oidium gentianæ		0
Zygosaccharomyces	Chodati	8,18
Saccharomyces	sp.	8,18
»	Zopfii	8,18
»	Lendneri	7,74
»	gentianæ	7,74
»	juillardensis	8,18
Pichia gentianæ		3,6
» farinosa		5,39
» juratensis		6,55
Torula gentianæ		1,73

DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE

Le *Gentiana lutea* L. étant une plante aux appétences franchement calcicoles doit donc être limitée aux montagnes calcaires. On la trouve dans l'Europe moyenne, de la Sierra d'Estrella au Portugal jusqu'en Asie Mineure au Boz Dagh.

On ne la connaît au Portugal que de cette station où elle est même aujourd'hui assez rare, car « elle fut impitoyablement poursuivie par les bergers qui la vendaient aux pharmaciens des environs », nous écrit M. le professeur Pereira Coutinho.

En Espagne, elle devient déjà plus abondante. On la trouve en Galicie, dans les Asturies, dans les Monts Cantabres, l'Ancienne Castille, l'Aragon, la Catalogne et partout dans les Pyrénées.

De là, elle passe en France, sur tout le Plateau central, dans la Côte d'Or, l'Yonne, la Creuse, la Haute-Vienne, ainsi que sur toute la chaîne des Alpes, le Jura et les Vosges. Dans la Côte d'Or, elle descend jusqu'à 290 mètres d'altitude, tandis que dans le Valais sa limite inférieure est 450 mètres.

En Suisse, elle suit toute la chaîne du Jura, où elle est très abondante et y caractérise bien le pâturage jurassien. On la rencontre également sur les Préalpes et dans les massifs alpins à affleurements calcaires. Cette plante s'hybridise alors facilement avec ses proches parents : les *Gentiana purpurea* L. et *G. punctata* L..

En Allemagne, elle se rencontre dans les Vosges, la Forêt-Noire et en Bavière. Une petite station se trouve en Thuringe près d'Arnstadt.

Sa distribution pour l'Autriche s'étend sur tout le massif alpin, surtout dans le Tyrol, Vorarlberg, puis en Carinthie, Croatie, l'Istrie, Goritzia, Trieste. Dans cette aire orientale, Murbeck y a distingué une sous-espèce *symphyandra* Mürb., dont les étamines sont soudées entre elles par les anthères. De là, elle s'étend en Bosnie-Herzégovine, puis saute aux Carpathes où elle est localisée dans la partie occidentale (Rodnaër Alpen, Bürzenländer et Biharia). On la rencontre également sur les Carpathes roumaines.

Fig. XXVIII. — Distribution géographique du *Gentiana lutea* L. En noir, la répartition géographique des contrées où l'on distille de la gentiane.

Il s'en détache du côté du Sud une aire qui s'étend en Italie vers les Alpes lombardes et vénitiennes ; elle se retrouve dans l'Apennin central et sur les îles de Sardaigne et de Corse.

Plus on s'approche de l'Orient, plus l'aire se disloque ; elle se réduit à une seule station connue en Macédoine (Peristeri sur Bitolia), une dans l'Olympe de Bithynie et une même en Asie Mineure, au Mont Tmolo sur Boz Dagh (Lydie).

La distribution géographique de cette plante a été fixée sur la carte (fig. 28) sous forme d'un pointillé. On voit donc que c'est une espèce montagnarde de toute l'Europe moyenne, dont l'aire s'étend du Portugal à l'Asie Mineure. Il ressort en outre de cet exposé que sa patrie de prédilection est l'Europe centrale représentée par le Jura et les Alpes calcaires.

Sur cette carte, on a également donné en taches noires la distribution géographique des endroits où se pratique la fermentation de la racine.

On voit dès lors que la fabrication d'eau-de-vie de gentiane n'a lieu que dans l'Europe centrale : dans la partie septentrionale du Plateau central, le Jura, les Alpes, la Corse, la Sardaigne et les Carpathes occidentales.

Dans les autres régions, on se borne à l'arracher pour des usages pharmaceutiques, car elle est souvent peu abondante. Mais ce qu'il faut noter, c'est que partout les gens du pays connaissent ses propriétés amères et fébrifuges et la récoltent comme médicament.

APPENDICE
Biologie et anomalies florales

Pendant l'été 1915, nous avons étudié la biologie de la fleur du *Gentiana lutea* L., dans le Jura bernois, au Mont-Soleil, à 1150 mètres d'altitude.

Cette fleur possède un calice très spécial qui, avant l'anthèse, recouvre tout l'intérieur de la fleur très solidement. Les pétales, à ce moment, sont enroulés sur eux-mêmes et forment une pointe très rigide à leur extrémité. Par la pression que cet ensemble exerce, les cinq courtes lanières qui terminent le calice, sont séparées. Celui-ci ensuite, sous la pression et la dilatation exercées par les pétales se rompt sur une de ses faces, jusque presque à la base. Il forme ainsi un organe ressemblant beaucoup à une spathe. Finalement, il est même plus ou moins retroussé à sa base comme un doigt de gant et il permet alors aux pétales et aux étamines de s'écarter. Le calice se dessèche et tombe assez rapidement.

On remarquera au sommet des pétales la petite gouttière qui permettait la réunion très intime de ceux-ci au moment de la floraison. On a signalé des mouvements d'étamines vers les stigmates comme chez *Parnassia*. Nous avons examiné beaucoup de fleurs sans jamais voir ce phénomène.

On remarque en outre une très légère protandrie.

Tout en faisant nos observations nous avons noté des visites d'insectes assez fréquentes, surtout d'Hyménoptères et de Diptères. L'ovaire repose sur un socle nectarifère qui attire les insectes.

Dans cette même région, nous avons trouvé un pied, dont la plupart des fleurs avaient un type floral différent du type normal quiest: Cal. : 5; Cor. : 5; A. : 5; G. : 2. Dans la statistique qui va suivre, il n'a pas été tenu compte des pièces calcinales, celles-ci étant souvent soudées entre elles ou rudimentaires.

Nous avons noté pas moins de 16 types floraux sur le même pied. Toutes ces pièces florales étaient parfaitement conformées, de sorte qu'il a été très facile de les compter.

Voici, rangées en quatre groupes (d'après le nombre identique des pièces corollaires) les 16 types :

1° Groupe des fleurs à 5 pièces à la corolle :

C. : 5.	A. : 5.	G. : 2.	(25 exemplaires.)
C. : 5.	A. : 5.	G. : 3.	(3 »)
C. : 5.	A. : 6.	G. : 2.	(5 »)
C. : 5.	A. : 6.	G. : 3.	(1 »)
C. : 5.	A. : 7.	G. : 2.	(1 »)

2° Groupe des fleurs ayant 6 pièces à la corolle :

C. : 6.	A. : 5.	G. : 2.	(22 exemplaires)
C. : 6.	A. : 6.	G. : 2.	(8 »)
C. : 6.	A. : 6.	G. : 3.	(5 »)
C. : 6.	A. : 7.	C. : 2.	(3 »)

3° Groupe des fleurs ayant 7 pièces à la corolle :

C. : 7.	A. : 5.	G. : 2.	(1 exemplaire.)
C. : 7.	A. : 6.	G. : 2.	(4 »)
C. : 7.	A. : 7.	G. : 2.	(3 »)
C. : 7.	A. : 7.	G. : 3.	(4 »)

4° Groupe des fleurs ayant 8 pièces à la corolle :

C. : 8.	A. : 8.	G. : 2.	(2 exemplaires)
C. : 8.	A. : 8.	G. : 3.	(1 »)
C. : 8.	A. : 8.	G. : 4.	(1 »)

On remarquera l'enchevêtrement de tous ces types et la grande variation, sorte de permutation. Le nombre des stigmates dans un cas est même doublé. On sent une tendance vers le dédoublement des pièces florales. Dans aucune fleur il n'a été constaté un nombre inférieur de pièces à celui de la normale.

Ces quelques observations sont d'autant plus intéressantes que dans les gentianes d'autres groupes (endotriches) se rencontre le type 4.

3 0112 072816744